Farbreaktionen des Ampicillins und anderer partialsynthetischer Penicilline

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard König
aus Bietigheim

1978

Farbreaktionen des Ampicillins und anderer partialsynthetischer Penicilline

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard König
aus Bietigheim

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 1978

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1974 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im März 1978 abgeschlossen.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. H. Auterhoff,
danke ich für die Anregungen und die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

EINLEITUNG 1

A REAKTIONEN MIT CHROMOTROPSÄURE UND SCHWEFELSÄURE 7

I. Reaktionen der Penicilline der Ph. Eur. II . . . 7
1. Penicillin G 7
2. Ampicillin 8
3. Penicillin V 10
a) Variation der Reaktionsbedingungen 11
b) Herstellung und Untersuchung der farbigen Substanzen 11
c) Reaktionsweg 13
d) Nachweis des gebildeten Formaldehyds . . . 20

II. Reaktion der Penicilline der Brit. 1973 22
1. Carbenicillin 22
2. Phenethicillin 23
3. Propicillin 27

III. Reaktionen des Cefapirins 29

B WEITERE NACHWEISREAKTIONEN FÜR AMPICILLIN . . . 32

I. Nachweis von Ampicillin mit Kupfersalzen 36

II. Nachweis von Ampicillin mit Mandelin's Reagens . 39

III. Nachweis von Ampicillin durch Diazotierung . . . 41

C ZUSAMMENFASSUNG 43

D BESCHREIBUNG DER VERSUCHE 45

EINLEITUNG

Die gebräuchlichen Penicilline sind Derivate der 6-Aminopenicillansäure. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche partialsynthetische Penicilline in die Therapie eingeführt. Die neuen Penicilline sind häufig gegen Säuren stabiler und ihre Empfindlichkeit gegen Penicillinase ist geringer, außerdem ist ihr Wirkungsspektrum in der Regel breiter.

Bei der Darstellung der partialsynthetischen Penicilline geht man von der 6-Aminopenicillansäure aus, die heute meist chemisch aus Penicillin G gewonnen wird[1]. Die 6-Aminopenicillansäure wird mit den Chloriden der Säuren, die als Säurekomponenten eingeführt werden sollen, umgesetzt.

Da sich Penicilline chemisch nur durch die Säurekomponente unterscheiden, ist es relativ schwierig, sie zu identifizieren. Man wendet dafür chromatographische und spektralphotometrische Methoden an.

Das Europäische Arzneibuch Band II gibt eine Farbreaktion an, die es erlauben soll, sehr schnell und ohne apparativen Aufwand einige der gebräuchlichsten Penicilline zu unterscheiden.

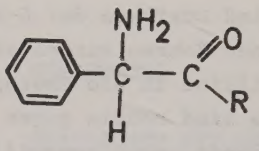
In der British Pharmacopoeia 1973 ist die Tabelle der Substanzen, die diese Farbreaktion geben sollen, um einige weitere Penicilline erweitert.

Erstes Ziel dieser Arbeit war zunächst die Überprüfung dieser Farbreaktion und die Aufklärung der farbigen Produkte, die bei den in der Ph. Eur. II aufgeführten Penicilline entstehen.

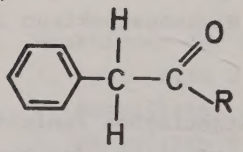
---

1) D.A. Johnson, C.A. Panetta und R.R. Smith, J.Org.Chem. 31, 2560 (1966).

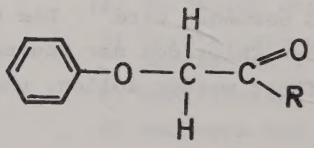
Untersucht wurden die Penicilline der Ph. Eur. II:



Ampicillin
gebräuchlich als
D-Form

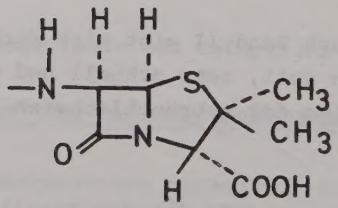


Benzylpenicillin
= Penicillin G

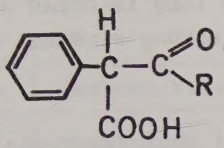


Phenoxymethylpenicillin
= Penicillin V

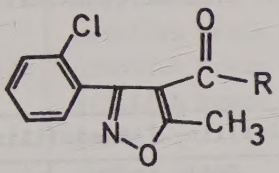
R = 6-Aminopenicillansäurerest



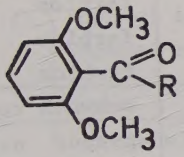
Bei den in der Brit. 1973 zusätzlich berücksichtigten Penicillinen handelt es sich um:



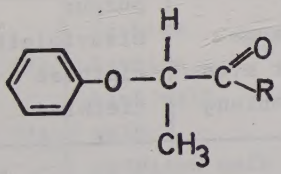
Carbenicillin
(Na-Salz)



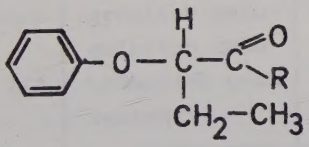
Cloxacillin
(Na-Salz)



Methicillin
(Na-Salz)



Phenethicillin
(K-Salz)



Propicillin
(K-Salz)

Die Farbreaktion der Ph. Eur. II und der Brit. P. wird in der Weise durchgeführt, daß man das zu prüfende Penicillin mit Chromotropsäure in konzentrierter Schwefelsäure erhitzt und die Färbung in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet.

Nach der Arbeitsvorschrift werden 2 mg des betreffenden Penicillins mit 2 mg Chromotropsäure in 2 ml 96 %iger Schwefelsäure im Reagenzglas 4 min lang im Ölbad auf 150° C erhitzt. Die Färbung der Mischung wird mit einer Farbskala verglichen.

Angaben der Tabelle aus Ph. Eur. II über das Verhalten der einzelnen Penicilline bei der Chromotropsäurereaktion.

Zeit	Ampicillin	Benzylpenicillin	Penicillin V
0 min	farblos	gelb	farblos
1/2	farblos	gelb	farblos
1	farblos	gelb	farblos
1 1/2	farblos	orangegelb	schwach rosa
2	purpur	orangegelb	purpur
2 1/2	tief purpur	orangegelb	purpur
3	violett	schwach orange	blauviolett
3 1/2	violett	orange oder even-	tiefblau
4	Verkohlung	tuell Verkohlung	tiefblau

Tab. 1

Die Angaben der Brit. 1973 über das Verhalten der zusätzlich aufgeführten Penicilline bei der Chromotropsäure-Reaktion.

min	Carbenicillin	Cloxacillin	Methicillin
0	farblos	farblos	gelb
1/2	hell braun	blaß gelb	grünlich gelb
1	gelblich braun	grünlich gelb	grünlich gelb
1 1/2	grünlich braun	gelblich grün	grünlich gelb
2	grünlich braun	grün	gelblich grün
2 1/2	braun	grünlich purpur	gelblich grün
3	dunkel braun	purpur	gelblich braun
3 1/2	dunkel braun	purpur	gelblich braun
4	dunkel braun	purpur	verkohlt

min	Phenethicillin	Propicillin
0	farblos	farblos
1/2	farblos	blaß gelb
1	blaß gelb	blaß gelb
1 1/2	gelb	gelb
2	grünlich gelb	gelb
2 1/2	grünlich gelb	rötlich gelb
3	gelblich grün	rötlich gelb
3 1/2	bräunlich grün	bräunlich gelb
4	verkohlt	gelblich braun

Tab. 2

In der Brit. 1973 wird darauf hingewiesen, daß N,N'-Dibenzyläthylendiamindipenicillin G (Benzathine Penicillin G), Benzylpenicillin und Procain-Penicillin G blaß gelbe Färbungen geben, bevor die Lösungen verkohlen.

Freed[2] hat die Reaktion mit Chromotropsäure und Schwefelsäure für insgesamt 26 Säuren beschrieben, hauptsächlich halogenierte Phenylessigsäuren und Phenoxyessigsäuren.

G. Parker, R.J. Cox und D. Richards[3] haben diese Reaktion für Penicilline angewendet, aber auch andere Substanzen untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Verbindung	Chromotropsäure + Schwefelsäure	Schwefelsäure
Blindprobe	blaß gelb	farblos
Phenoxyessigsäure	tief rot	braun
p-Bromphenoxyessigsäure	tief rot	tief braun
Penicillin V	tief blau purpur	orange braun
Phenylessigsäure	blaß gelb	farblos
Penicillin G Na.	braun	hellbraun
Procainhydrochl.	gelb-grün	farblos
Procain Pen. G	rotbraun	blaß gelb
N,N'-Dibenzyläthylendiaminsulfat	gelbgrün	farblos
" " dipenicill. G	tief rot	gelbbraun
Carboxymethylcellulose	schwarz	schwarz

Tab. 3

Über einen möglichen Reaktionsmechanismus oder über ein eventuell entstandenes Farbprodukt findet man bei den genannten Autoren keine Angaben. Auterhoff und Kovar[4] sprechen im Zusammenhang mit Penicillin V die Vermutung aus, daß aus dem Molekül Formaldehyd abgespalten wird, der dann mit der Chromotropsäure reagiert. Beim Ampicillin ist diese Reaktion aber unwahrscheinlich.

---

2) V.H. Freed, Science 107, 98 (1948).

3) G. Parker, R.J. Cox und D. Richards, J.Pharm.Pharmacol. 7, 683 (1955).

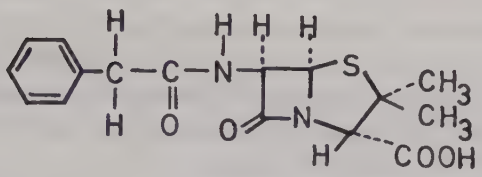
4) H. Auterhoff und K.A. Kovar, Identifizierung von Arzneistoffen, 3. Aufl. Wissenschaftl. Verlags GmbH, Stuttgart 1977.

A REAKTIONEN MIT CHROMOTROPSÄURE UND SCHWEFELSÄURE

Die Chromotropsäurereaktion wurde mit den Penicillinen der Ph. Eur. II und einiger Teilstrukturen dieser Moleküle durchgeführt und die Resultate mit den Angaben des Arzneibuches verglichen.

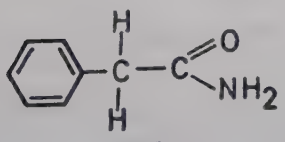
I. Reaktionen der Penicilline der Ph. Eur. II

1. Penicillin G

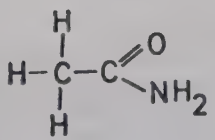


Bei der Überprüfung der Reaktion von Penicillin G nach den Angaben der Ph. Eur. II wurde weitgehende Übereinstimmung gefunden, es treten nur gelb-orange Färbungen auf und die Reaktion verläuft, wenn man die rot-violett-Färbung als positiv bezeichnet, mit Penicillin G negativ.

Negativ waren auch die Ergebnisse mit Phenylessigsäureamid und Acetamid, die man als Teilstrukturen des Penicillin G Moleküle ansehen kann.

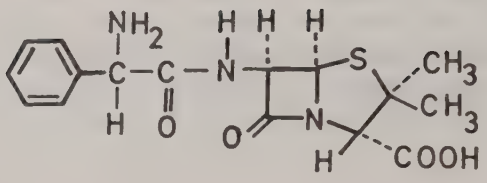


Phenylessigsäureamid



Acetamid

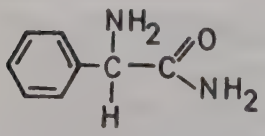
2. Ampicillin



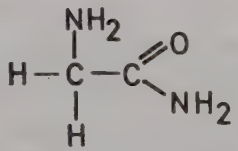
Ampicillin gibt unter den Bedingungen der Ph. Eur. II kein eindeutiges Ergebnis. Es ist auch bei sehr genauem Einhalten der Temperatur und der Menge der gleichen Ampicillincharge nicht möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. In circa der Hälfte der durchgeführten Versuche trat, wie von der Ph. Eur. II gefordert, eine rötliche oder violette Färbung auf; es resultierten aber auch grüne, braune oder sehr blaß gelbliche Färbungen.

Die Prüfung für Ampicillin sollte daher in der Ph. Eur. II gestrichen werden.

Auch mit Substanzen, die Teilstrukturen des Ampicillins entsprechen, wie Phenylglycinamid oder Glycinamid, erhält man nur Gelb- und Braunfärbungen.



Phenylglycinamid



Glycinamid

Beim Phenylglycinamid läßt sich unter den Reaktionsbedingungen der Ph. Eur. II Benzaldehyd nachweisen, jedoch kein Formaldehyd.

Soeben ist bekannt geworden*), daß die Europäische Arzneibuchkommission statt der Reaktion mit Schwefelsäure und Chromotropsäure, deren Ergebnisse nicht voll befriedigen, die Reaktion mit Schwefelsäure und Formaldehyd diskutiert.

Die Reaktion wird mit 27 in einer Tabelle genannten Penicillinen und Cefalosporinen in 4 Schritten durchgeführt:

1. mit Schwefelsäure
2. mit Schwefelsäure eine Minute erhitzen
3. mit Formaldehyd und Schwefelsäure
4. mit Formaldehyd und Schwefelsäure eine Minute erhitzen.

Die dabei auftretenden Färbungen werden mit Angaben in der Tabelle verglichen. Es treten, besonders bei dem dritten und vierten Schritt der Reaktion, auffällige Färbungen auf, meist gelb-orange bis rötlich-braune Farben, die es erlauben sollen, die Substanzen zu charakterisieren. Allerdings scheint diese Methode nur wenige Vorteile gegenüber der Chromotropsäurereaktion zu besitzen. Dies soll an einer Gegenüberstellung verdeutlicht werden.

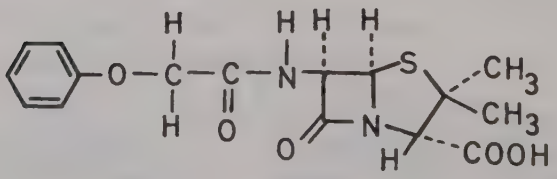
Substanz	H_2SO_4 + Chromotropsäure (nach 3 min)	H_2SO_4 + Formaldehyd (1 min bei 100°)
Ampicillin	violett (?)	dunkel gelb
Benzylpenicillin	gelb braun	rötlich braun
Carbenicillin	dunkel braun	hell braun gelb
Cloxacillin	purpur	hell-gelb
Methicillin	gelblich-braun	grün-gelb
Phenethicillin	gelblich-grün	rot-braun
Penicillin V	blauviolett	rotbraun
Propicillin	rötlich-gelb	rotbraun

*) Entwürfe der Europäischen Arzneibuchkommission 1978.

Das Spektrum der auftretenden Farben ist bei der Chromotropsäurereaktion größer, allerdings ist die Reaktion mit Formaldehyd-Schwefelsäure bequemer durchführbar, da es in der Praxis nicht einfach ist, die für die Durchführung der Chromotropsäurereaktion notwendige Temperatur von 150° des Ölbads konstant zu halten. Außerdem ist positiv, daß die ursprünglich falschen Angaben für Ampicillin korrigiert werden.

Als Produkte der Reaktion mit Formaldehyd in Schwefelsäure sind theoretisch Polymere zu erwarten, bei denen die aromatischen Ringe der Säurekomponenten der geprüften Substanzen über Polyoxymethylenbrücken verknüpft sind. Solche Substanzen sind gewöhnlich rötlich bis braun gefärbt[5], dies stimmt mit den in der Tabelle angegebenen Färbungen überein. Nur bei phenolischen Substituenten, die in dieser Stoffklasse nicht vorkommen, sind Methylenbrücken zu erwarten.

3. Penicillin V



Penicillin V verhält sich bei der Chromotropsäurereaktion so, wie in der Ph. Eur. angegeben ist und führt zu Rotviolettfärbungen, die - wie theoretisch zu erwarten - auf dem intermediär gebildeten Formaldehyd beruhen.

---

5) R. Wegler und Mitarbeiter, Angew. Chem. 60, 88 (1948).

a) Variation der Reaktionsbedingungen

Bei der Variation der Reaktionsbedingungen zeigte es sich, daß die Konzentrationen von Penicillin V und Chromotropsäure in weitem Umfang verändert werden können, ohne daß sich dadurch der Reaktionsablauf ändert.

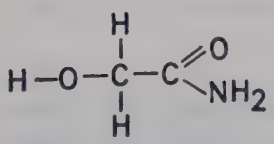
Verändert man aber die Konzentration der Schwefelsäure, so ändert sich der Reaktionsablauf: Ist die Konzentration geringer als 80 Prozent, so tritt innerhalb von 30 min keine Färbung auf.

In anderen konzentrierten Säuren wie Salpetersäure, Salzsäure, Perchlorsäure oder Phosphorsäure verläuft die Reaktion negativ.

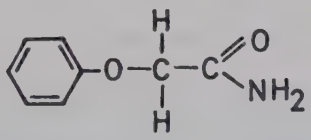
Varriiert man die Temperatur, so tritt unterhalb von 100° C innerhalb einer Stunde keine Färbung auf, bei 120° C erhält man nach 20 min eine blaß violett gefärbte Lösung, die nach einer Stunde die intensive blauviolette Färbung der Originalreaktion nach Ph. Eur. II gibt.

b) Herstellung und Untersuchung der farbigen Substanzen

Unterwirft man Teilstrukturen des Penicillin V-Moleküls wie Glykolsäureamid oder Phenoxyessigsäureamid der Chromotropsäurereaktion, so resultiert jeweils eine intensive blauviolette Färbung.



Glykolsäureamid



Phenoxyessigsäureamid

Die Elektronenspektren der Reaktionsgemische sind nahezu identisch und entsprechen dem Spektrum von Penicillin V.

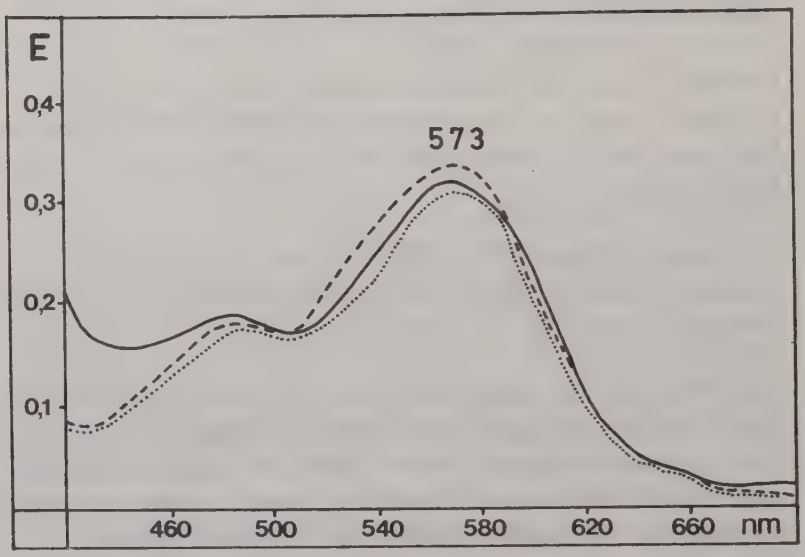


Abb. 1: Elektronenspektren der Chromotropsäurereaktion mit ——— Penicillin V, ... Phenoxyessigsäureamid, - - - Glykolsäureamid.

Aus den Spektren kann man schließen, daß sich aus allen drei Substanzen derselbe farbige Stoff bildet. Um dies zu überprüfen wurde versucht, die farbigen Substanzen rein darzustellen.

Penicillin V und Chromotropsäure wurden auf dem Ölbad auf 150° C erhitzt und nach dem Erkalten auf eiskaltes Aceton gegossen. Dabei bildete sich ein blauvioletter Niederschlag, der auf einer Nutsche gesammelt und mit Aceton und Äther ausgewaschen wurde.

Auf gleiche Weise wurden aus Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid blauviolette farbige Produkte gewonnen.

Die Dünnschichtchromatographie zeigte, daß die Produkte aus Penicillin V, Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid identisch waren.

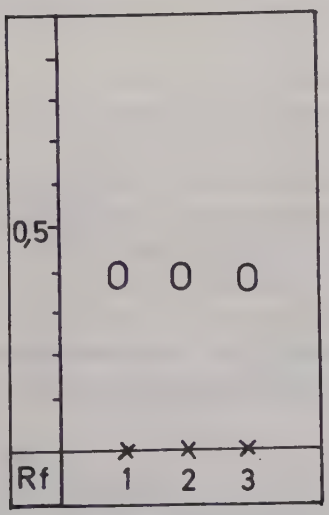


Abb. 2:
DC der Produkte der Chromotropsäurereaktion mit
1. Penicillin V
2. Phenoxyacetamid
3. Glykolsäureamid

Fließmittel: Aceton/ Wasser/Eisessig = 8/2/1

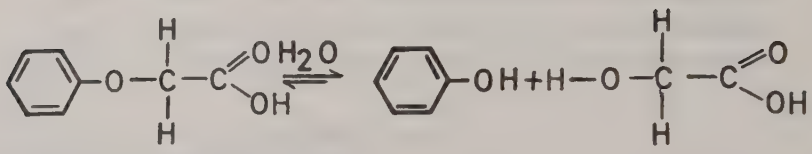
Alle Flecke sind blaß blau gefärbt

c) Reaktionsweg

Es war zu vermuten, daß die farbigen Substanzen aus abgespaltenem Formaldehyd und Chromotropsäure entstehen.

Werden Penicilline in ein wäßriges saures oder alkalisches Milieu gebracht, so wird zuerst der β-Laktamring, unter verschärften Bedingungen aber auch die Säureamidbindung, gespalten. Dabei entsteht im Falle des Penicil-

lin V Phenoxyessigsäure[6)7)8)9)10)], die zu Phenol und Glykolsäure hydrolysiert wird.



Phenoxyessigsäure Phenol Glykolsäure

Glykolsäure zersetzt sich in heißer Schwefelsäure zu H_2O, CO_2 und Formaldehyd, der zum Teil polymerisiert[11)].

Die Reaktion verläuft wahrscheinlich nicht über die Glyoxylsäure, da diese unter den beschriebenen Bedingungen keine blauviolette Färbung gibt.

Formaldehyd gibt mit Chromotropsäure und Schwefelsäure eine rot- bis blauviolette Färbung, die je nach den Versuchsbedingungen auf verschiedenen Produkten basieren kann.

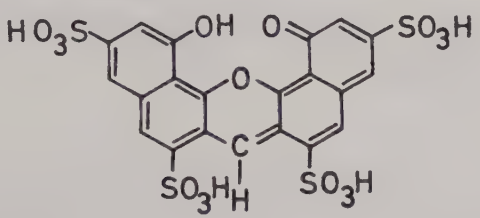
Die Reaktion wurde von Eegriwe[12)] so durchgeführt, daß Formaldehyd Chromotropsäure und Schwefelsäure auf dem Wasserbad auf höchstens 80° erwärmt werden.

---

6) H.D. Rapson und A.E. Bird, J.Pharm.Pharmacol. 15, 22T (1963).
7) B.B. Lewine, Arch.Biochem.Biophys. 93, 50 (1961).
8) M.A. Schwartz, J.Pharmac.Sci. 54, 472 (1955).
9) K.W. Merz, H. Lehmann, Pharmazie 20, 764 (1965).
10) H. Kienzler, Dissertation, Tübingen 1971.
11) W. Heintz, Liebigs Ann.Chem. 138, 41 (1866).
12) E. Eegriwe, Microchem.Acta 2, 329 (1937).

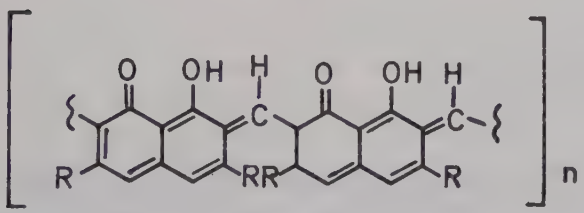
Nach Bricker und Vail[13] wird Formaldehyd mit Chromotropsäure auf dem Ölbad bei höchstens 200° C eingedampft, anschließend wird die Schwefelsäure zugesetzt.

Fuchs[14] fand, daß bei der Reaktion nach Eegriwe hauptsächlich ein Dibenzoxanthenderivat entsteht.



Xanthenderivat aus Formaldehyd und Chromotropsäure nach Eegriwe

In der Variante nach Bricker und Vail entsteht überwiegend ein polymeres Molekül.



R = 50 % H
R = 50 % SO_3H

Polymeres Produkt aus Formaldehyd und Chromotropsäure nach Bricker und Vail

13) C.E. Bricker und W.A. Vail, Analytic.Chem. 22, 720 (1950).

14) K. Fuchs, Dissertation, Tübingen 1968.

Die beiden farbigen Produkte wurden dünnschichtchromatographisch mit den farbigen Produkten aus Penicillin V, Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid verglichen.

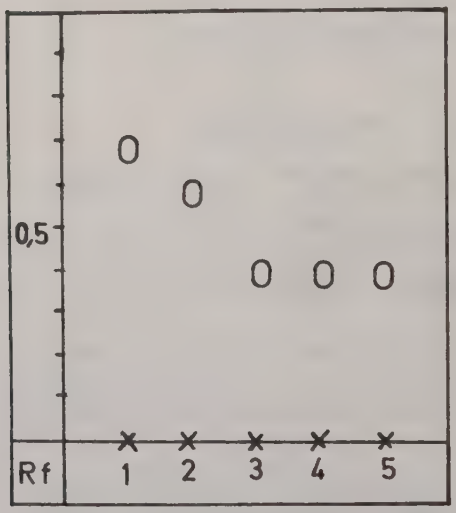


Abb. 3:
DC der farbigen Produkte der Chromotropsäurereaktion

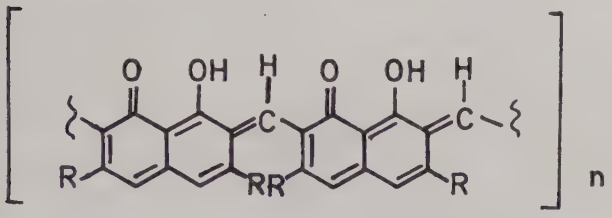
Fließmittel: Aceton/ Eisessig/Wasser = 8/2/1

Produkte aus
1 = Formaldehyd nach Bricker/Vail
2 = Formaldehyd nach Eegriwe
3 = Penicillin V
4 = Phenoxyacetamid
5 = Glykolsäureamid

Man kann aus dem DC entnehmen, daß die farbigen Produkte aus Penicillin V, Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid weder mit dem Eegriwe- noch mit dem Bricker und Vail-Produkt identisch sind.

Auch die bei der Elementaranalyse gefundenen Werte der beiden Produkte aus Formaldehyd und des Produkts aus Penicillin V stimmen nicht überein, so hatte die aus Penicillin V gewonnene Substanz einen höheren S-Anteil.

Die Befunde sprechen für ein polymeres Molekül mit dem Gerüst des Bricker und Vail-Produktes, das jedoch pro Moleküleinheit 3 SO_3H-Gruppen enthält.



R = bei dem Produkt nach Bricker und Vail:
50 % H, 50 % SO_3H
R = bei dem Produkt aus Penicillin V:
75 % SO_3H, 25 % H

Vergleicht man die Herstellungsbedingungen der beiden Substanzen, so beruht der Unterschied darauf, daß das Produkt aus Penicillin V nur 4 min auf 150° C erhitzt wird; zur Bildung des Bricker und Vail-Produktes wird aber mehrere Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Anscheinend erfolgt die Abspaltung der ersten SO_3H-Gruppe pro Moleküleinheit schneller als die der zweiten, so daß dieses Produkt unter den beschriebenen Bedingungen als einheitliches Produkt isoliert werden kann. Der größere Anteil an SO_3H-Gruppen erklärt das unterschiedliche Verhalten auf dem DC.

Unterwirft man das farbige Produkt aus Penicillin V einem 4-stündigen Erhitzen auf dem Wasserbad auf 60° C, so entsteht das Produkt, das sich aus Chromotropsäure und Formaldehyd unter den Bedingungen von Bricker und Vail bildet.

Vergleicht man die Elektronenspektren der beiden aus Formaldehyd und Chromotropsäure gewonnenen Substanzen mit dem Spektrum, das man bei der Reaktion von Penicillin V erhält, so findet man weitgehende Übereinstimmung des Produktes aus Formaldehyd nach Bricker und Vail mit dem Produkt aus Penicillin V.

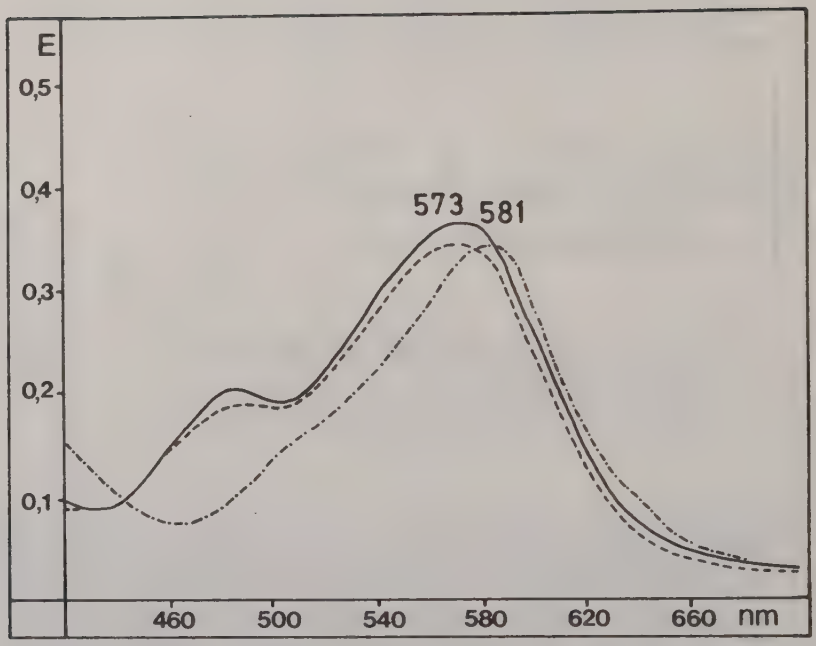


Abb. 4: Elektronenspektren der isolierten farbigen Substanzen der Chromotropsäurereaktion:

- - - - Penicillin V
-·-·- Formaldehyd (Eegriwe)
——— Formaldehyd (Bricker/Vail)

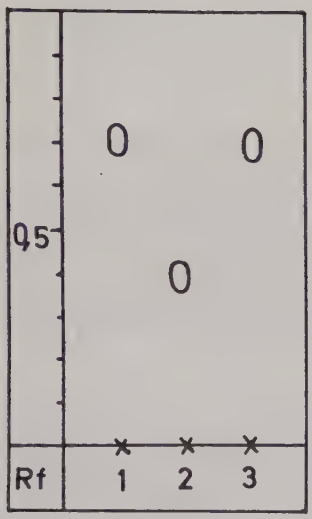


Abb. 5:
DC der isolierten farbigen Produkte der Chromotropsäurereaktion mit:
1 = Formaldehyd nach Bricker und Vail
2 = Penicillin V
3 = Penicillin V, zusätzlich 4 Stunden auf 60° C erwärmt

Fließmittel: Aceton/Eisessig/Wasser = 8/2/1

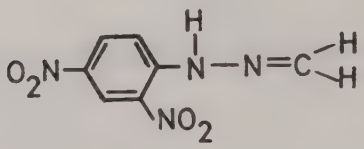
Zusammenfassend ergibt sich, daß sich bei der Reaktion von Penicillin V mit Chromotropsäure in Schwefelsäure nach 4-minütigem Erhitzen auf 150° C ein farbiges polymeres Molekül bildet, dessen Elektronenspektrum fast identisch ist mit dem Produkt aus Formaldehyd und Chromotropsäure, das jedoch eine Sulfonsäuregruppe mehr pro Moleküleinheit enthält. Durch 5-stündiges Erwärmen des primären farbigen Produktes auf 60° C mit konzentrierter Schwefelsäure wird eine SO_3H-Gruppe abgespalten und es entsteht eine Substanz, die der aus Formaldehyd hergestellten Substanz in allen geprüften Eigenschaften gleicht.

Zur weiteren Absicherung des Reaktionsweges wurde versucht, den aus Glykolsäureamid, Phenoxyacetamid und Penicillin V gebildeten Formaldehyd mit Dinitrophenylhydrazin abzufangen.

d) Nachweis des gebildeten Formaldehyds

1. Aus Glykolsäure:

Glykolsäure wird mit konzentrierter Schwefelsäure 4 min lang im Ölbad auf 150° C erhitzt, man verdünnt mit der doppelten Menge Wasser und gibt 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu. Dabei bildete sich ein Niederschlag, der sich bei der DC-Untersuchung als identisch mit dem Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon erwies. Auch die Schmelzpunkte der beiden Substanzen stimmten überein.



Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon

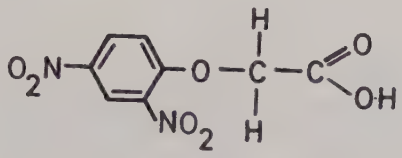
Ein Teil des Formaldehyds kondensierte als Polymer im Kühler aus; aus dem Kühler herausgeholte Substanz wurde durch die Chromotropsäurereaktion identifiziert.

2. Aus Phenoxyessigsäure:

Es war nicht möglich, aus Phenoxyessigsäure unter den oben beschriebenen Bedingungen ein Formaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon herzustellen.

Erhitzt man Phenoxyessigsäure in konzentrierter oder 80-prozentiger Schwefelsäure und gibt nach dem Abkühlen Chromotropsäure zu, so tritt keine Färbung auf. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß das bei der Spaltung gebildete Phenol unter diesen Bedingungen sofort mit dem ebenfalls entstehenden Phenol reagiert, so daß dieses nicht mehr nachweisbar ist.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde 2,4-Dinitrophenoxyessigsäure 4 min lang auf 150° C erhitzt.



2,4-Dinitrophenoxyessigsäure

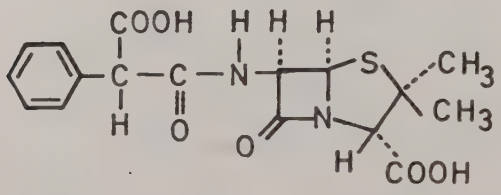
Die Substanz gibt bei der Spaltung Glykolsäure bzw. Formaldehyd und 2,4-Dinitrophenol, das mit Formaldehyd sehr viel langsamer reagiert. Wenn man nach dem Abkühlen Chromotropsäure zugibt, bildet sich eine blau-violette Färbung.

3. Aus Penicillin V:

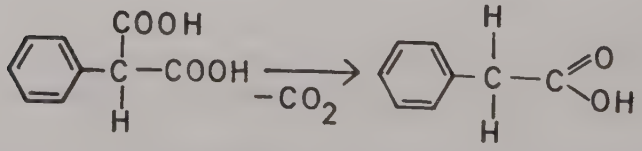
Es war nicht möglich, in der Schwefelsäurereaktion mit Penicillin V Formaldehyd abzufangen. Zusätzlich zu den Nachweisen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und Chromotropsäure wurde eine gaschromatographische Bestimmung durchgeführt. Es resultierten aber keine eindeutigen Ergebnisse, da Penicillin V sehr viele Bruchstücke bildet und der gebildete Formaldehyd entweicht.

II. Reaktion der Penicilline der Brit. 1973

1. Carbenicillin



Carbenicillin gibt bei der Chromotropsäurereaktion eine dunkelbraune Färbung. Diese beruht darauf, daß aus dem Molekül Phenylmalonsäure abgespalten wird, die mit Chromotropsäure und Schwefelsäure zu dunkelbraun gefärbten Produkten reagiert. Die Färbung beruht auf Verkohlung der Phenylmalonsäure. Carbenicillin wird in saurem Milieu zu Phenylmalonsäure und 6-Aminopenicillansäure gespalten. Die Phenylmolansäure ist allerdings durch DC nicht nachweisbar, da die Substanz unter den vorliegenden Bedingungen sehr schnell zu Phenylessigsäure decarboxyliert[15].



15) A.L. Bernoulli und W. Wege, Helv.Chim.Acta 2, 521 (1919).

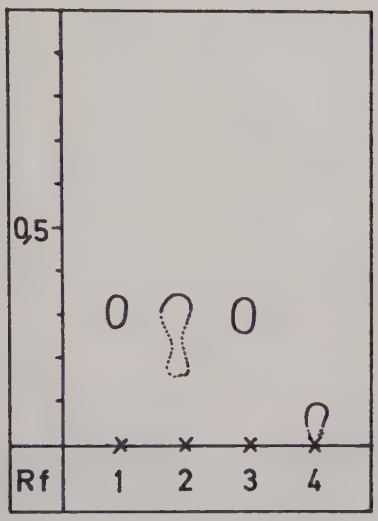
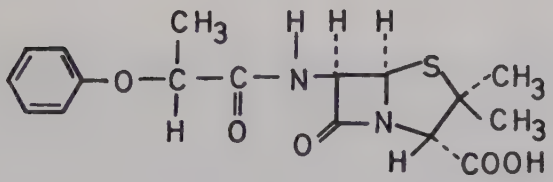


Abb. 6:
DC von Carbenicillin und Abbauprodukten nach der Chromotropsäurereaktion.
1. Phenylessigsäure
2. Phenylmalonsäure
3. Prod. aus Carbenicillin
4. Carbenicillin

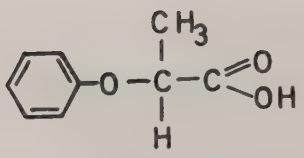
Fließmittel:
$CHCl_3$/Äthanol = 9/1
Detektion: UV-Lampe

Phenylmalonsäure reagierte mit mehreren geprüften Fließmitteln teilweise zu Phenylessigsäure.

2. Phenethicillin

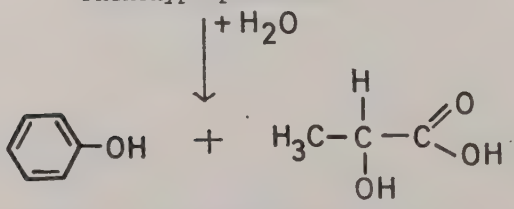


Führt man die Chromotropsäurereaktion mit Phenethicillin durch, so resultiert eine Grünfärbung. Bei einem Verlauf der Reaktion entsprechend Penicillin V wären folgende Produkte zu erwarten:

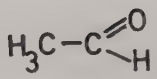


6-Aminopenicillans

Phenoxypropionsäure

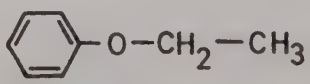


Phenol Milchsäure



Acetaldehyd (bzw. Paraldehyd oder Metaldehyd)

Zusätzlich kann durch Decarboxylierung aus Phenoxypropionsäure Phenyläthyläther entstehen.



Die DC-Untersuchung gab folgendes Ergebnis: Es konnten Phenoxypropionsäure und Phenyläthyläther als Abbauprodukte nachgewiesen werden.

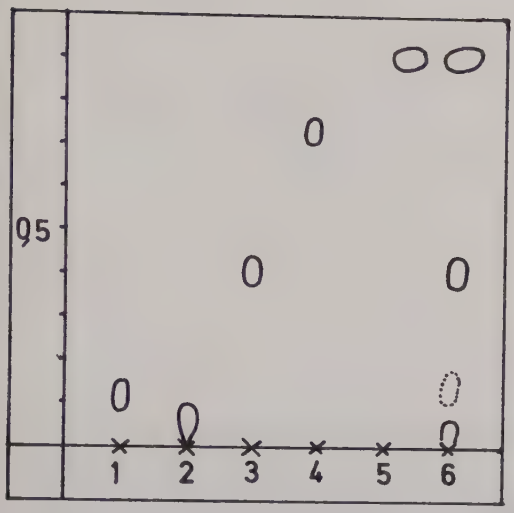
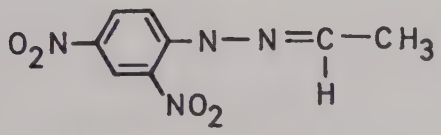


Abb. 7:
DC von:
1 = Phenethicillin
2 = 6-Aminop.Säure
3 = Phenoxypropionsäure
4 = Phenol
5 = Phenyläthyläther
6 = Produkte aus Phenethicillin bei der Chromotropsäurereaktion

Fließmittel:
$CHCl_3$/Äthanol = 9/1

Detektion: UV-Lampe

Acetaldehyd konnte als 2,4-Dinitrophenylhydrazon nachgewiesen werden, er zeigte sich auch durch seinen Geruch an.



Die Spaltprodukte des Phenethicillins wurden der Chromotropsäurereaktion unterworfen. In der Tabelle sind die Färbungen der Reaktionslösungen aufgeführt, die unter den Bedingungen der Ph. Eur. II entstehen.

Substanz	Farbe
Phenoxypropionsäure	gelblich braun
Milchsäure	gelb (verkohlt schnell)
Acetaldehyd	rötlich[16]
Metaldehyd	rötlich braun
Paraldehyd	rotbraun
Phenol	braun (verkohlt)
Phenyläthyläther	braun

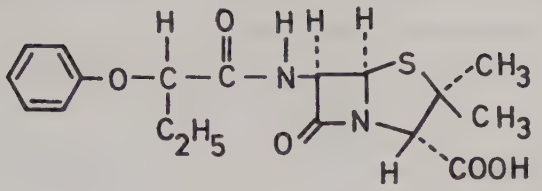
Tab. 5

Auffällig ist die bei der Durchführung der Reaktion mit Phenethicillin auftretende grüne Färbung. Wird die Lösung aber mit Wasser verdünnt, so verschwindet die grüne Färbung und die Lösung wird blau-violett. Diese Farbe bleibt auch bei weiterem Verdünnen bestehen. Das Elektronenspektrum der verdünnten Lösung zeigt bei 573 nm und 478 nm zwei Maxima. Dies entspricht dem aus Formaldehyd und Chromotropsäure nach Bricker und Vail entstandenen Produkt. Die Extinktion ist aber gering und sie beträgt nur wenige Prozent der bei Penicillin V auftretenden Werte. Möglicherweise entsteht sie aus der Verunreinigung des Phenethicillins mit Penicillin V.

Bei der grünen Farbe könnte es sich um eine Mischung handeln, die aus gelben und blau-violetten Komponenten entsteht. Beim Verdünnen mit Wasser verblaßt die gelbe Komponente (dies ist bei 6-Aminopenicillansäure der Fall!), während die blau-violette Komponente beständig ist.

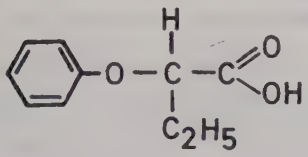
16) D. Braun, Dissertation Tübingen, 1972.

3. Propicillin



Propicillin gibt bei der Reaktion mit Chromotropsäure und Schwefelsäure nur gelb braune Färbungen, die wenig charakteristisch sind. Sie werden durch Spaltprodukte wie z.B. α-Phenoxybuttersäure verursacht.

Wenn man annimmt, daß die Reaktion entsprechend der des Phenethicillins verläuft, so sind folgende Spaltprodukte bei Propicillin zu erwarten:

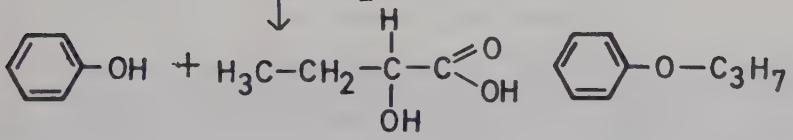


6-Aminopenicillansäure

Phenoxybuttersäure

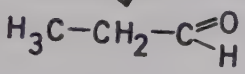
$-CO_2$

$-H_2O$



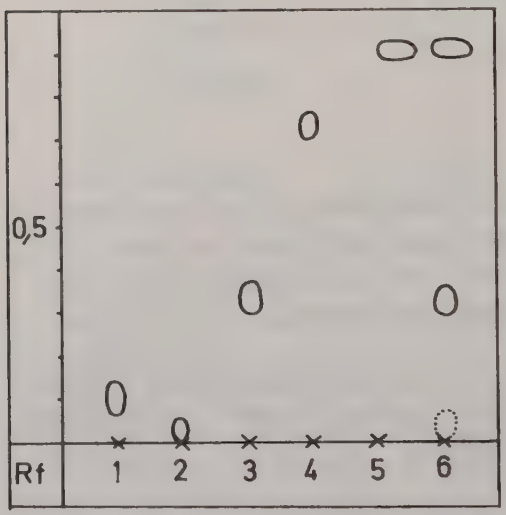
Phenol α-Hydroxybuttersäure Phenylpropyläther

$-CO_2$



Propionaldehyd

Dieser Reaktionsverlauf wurde durch die Dünnschichtchromatographie bestätigt, denn es waren α-Phenoxybuttersäure und Phenylpropyläther nachweisbar.



Fließmittel:
$CHCl_3$/Äthanol = 9/1

Detektion: UV-Lampe

Abb. 8: DC von Propicillin und Reaktionsprodukten nach der Chromotropsäurereaktion.
1 = Propicillin (als Säure)
2 = 6-APS
3 = Phenoxybuttersäure
4 = Phenol
5 = Phenylpropyläther
6 = Produkte aus Propicillin

Phenylpropyläther konnte in einem weiteren DC bei Verwendung von Benzol als Fließmittel bei RF 0,3 eindeutig identifiziert werden.

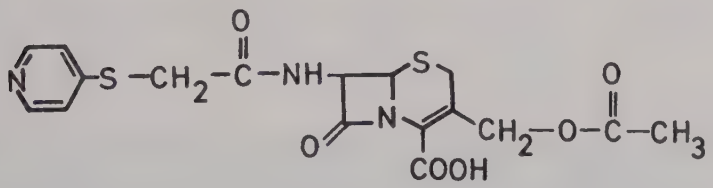
Vergleicht man die bei den Spaltprodukten auftretenden Färbungen mit der des Propicillins, so zeigt sich weitgehende Übereinstimmung.

Substanz	Farbe
Propicillin	gelblich braun
α-Phenoxybuttersäure	hell braun
Phenol	braun
Phenylpropyläther	gelb braun
Propionaldehyd	bräunlich (verkohlt schnell)

Tab. 6

III. Reaktionen des Cefapirins

Da es interessierte, ob die Chromotrop-Schwefelsäurereaktion der Penicilline auf die Cephalosporine übertragbar ist, wurde Cefapirin untersucht, das eine Säuregruppierung enthält, die möglicherweise bei der Reaktion ein positives Ergebnis geben könnte.



Cefapirin

Diese Vermutung bestätigte sich. Es resultierte eine blauviolette Farbe, das Elektronenspektrum zeigt zwei Maxima bei 574 und 478 nm, entsprechend dem Produkt aus Penicillin V (siehe Abb. 1).

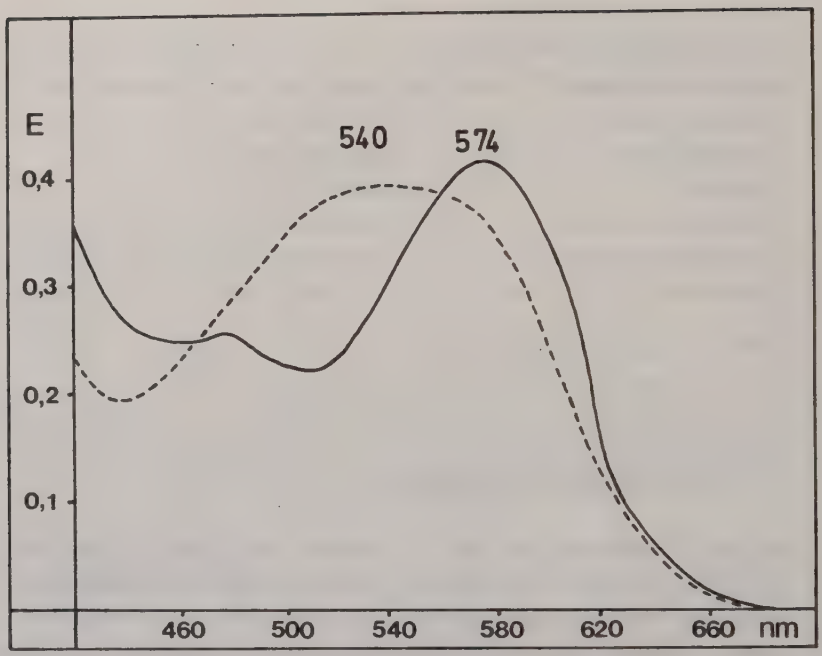
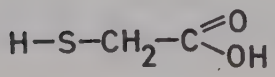
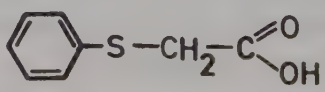


Abb. 9: Elektronenspektren der Chromotropsäurereaktion mit ——— Cefapirin und - - - Phenylthioglykolsäure.

Es wurden in Analogie zu dem Phenoxyessigsäurederivat der 6-Aminopenicillansäure Thioglykolsäure und anstelle der als Spaltprodukt zu erwartenden Pyridin-4-thioglykolsäure Phenylthioglykolsäure geprüft.



Thioglykolsäure



Phenylthioglykolsäure

Das Absorptionsmaximum der Phenylthioglykolsäure bei der Chromotropsäurereaktion ist im sichtbaren Bereich um 34 nm verschoben (λ max. = 540 nm). Bei Thioglykolsäure entsteht eine rotbraune Färbung allerdings schon beim Erhitzen auf 50°, bei höheren Temperaturen tritt Verkohlung auf. Aus diesem Grund wurde das Spektrum des Reaktionsprodukts der Thioglykolsäure nicht in Abb. 7 eingetragen, da die Reaktionen mit Phenylthioglykolsäure und Cefapirin bei 150° durchgeführt wurden und deshalb nicht vergleichbar waren.

B WEITERE NACHWEISREAKTIONEN FÜR AMPICILLIN

Da die Reaktion der Ph. Eur. II bzw. der Brit. 1973 bei Ampicillin nicht eindeutig verläuft, wurde versucht, eine Reaktion zu finden, die es ermöglicht Ampicillin zu identifizieren. Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, gibt Ampicillin mit einer Reihe gebräuchlicher Reagenzien keine Färbungen.

Reagens	Reaktion
H_2SO_4 konz.	keine Veränderung
Dragendorff's Reagens	" "
Ehrlich's Reagens	" "
Erdmann's Reagens	" "
Mayer's Reagens	" "
Fröhde's Reagens	" "
Marquis' Reagens	" "
$AgNO_3$	" "
Veränderungen traten auf bei:	
Mandelin's Reagens	Grünfärbung
$CuSO_4$ + NaOH	Violettfärbung

Tab. 7

Die Reaktionen, bei denen Färbungen auftraten, wurden mit den anderen in dieser Arbeit eingesetzten Penicillinen durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß die Reaktion mit Mandelin's Reagens bei einigen Penicillinen gleich ausfällt, während die Reaktion mit Kupfersulfat spezifisch ist für Ampicillin, aber nicht zur Unterscheidung derjenigen Penicilline dienen kann, die in der Säurekomponente ebenso wie Ampicillin eine Aminogruppe enthalten; es ist also die Reaktion mit $CuSO_4$ eine allgemeine Reaktion zum Nachweis von Penicillinen, die eine freie Aminogruppe in

der Seitenkette enthalten.

Reaktion von Mandelin's Reagens mit:

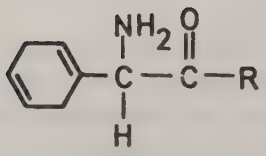
Penicillin G	keine Veränderung
Ampicillin	grün
Carbenicillin	violett
Cloxacillin	keine Veränderung
Methicillin	keine Veränderung
Phenethicillin	grün
Penicillin V	grün
Propicillin	grün
Beobachtet wurde jeweils drei Minuten nach Zugabe von 5 Tropfen des Reagenzes zu 10 mg Substanz auf der Tüpfelplatte.	

Tab. 8

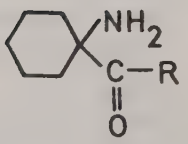
Reaktion von $CuSO_4$ und NaOH mit:

Penicillin G	wenig Veränderung
Ampicillin	violett
Carbenicillin	dunkelblau
Cloxacillin	wenig Veränderung
Methicillin	wenig Veränderung
Phenethicillin	wenig Veränderung
Penicillin V	blau grün
Propicillin	wenig Veränderung
Zusätzlich geprüft wurden weitere Penicilline, die eine Aminogruppe in der Seitenkette enthalten:	
Pivampicillin	violett
Epicillin	violett
Ciclacillin	violett
Beobachtet wurde die Färbung ca. 10 sek nach Zugabe von 10 mg Substanz in 2 ml Reagenzlösung aus 2 ml 10 %iger NaOH + 3 Tr 4 %ige $CuSO_4$-Lösung.	

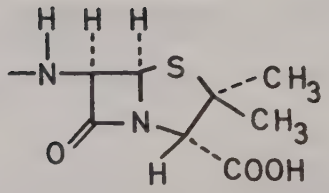
Tab. 9



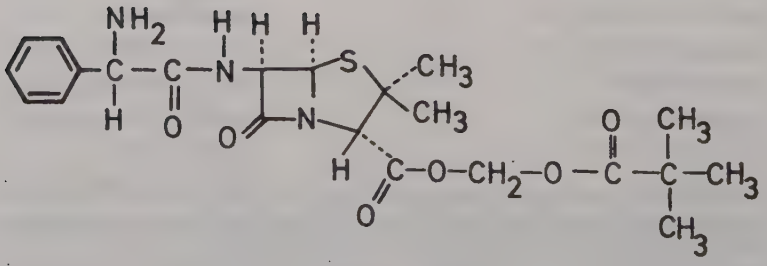
Epicillin



Ciclacillin



6-Aminopenicillansäurerest



Pivampicillin

Reaktion der Penicilline mit Kupfersulfat und Natronlauge

Einer Mischung aus 30 ml 2N-NaOH und 1 ml 4 %iger $CuSO_4$-Lösung wurde die dem Kupfersulfat äquimolare Menge des betreffenden Penicillins zugefügt, dies entspricht einer Konzentration von 0,16 Mol/Liter. Das Elektronenspektrum der entstandenen farbigen Lösung wurde im sichtbaren Bereich bestimmt, als Vergleich diente 2N-NaOH. Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Penicillin	Einwaage mg	λ max. nm	E
Penicillin G-Na	57,2	634	0,04
Ampicillin - Na	56,0	520	0,42
Carbenicillin DiNa.	67,8	588	0,10
Methicillin - Na	63,4	624	0,08
Phenethicillin - K	65,0	628	0,07
Penicillin V - K	63,1	618	0,04
Propicillin - K	67,0	620	0,07
Pivampicillin - Na	77,9	517	0,39
Epicillin	59,9	514	0,38
Ciclacillin - Na	52,9	515	0,40
Blindwert $CuSO_4$	-	628	0,07

Tab. 10

Aufgrund dieser Tabelle kann man die untersuchten Penicilline in zwei Gruppen einteilen; bei den gekennzeichneten Penicillinen handelt es sich um diejenigen Substanzen, die in der Seitenkette eine freie Aminogruppe enthalten. Bei diesen Substanzen liegt das Extinktionsmaximum im Bereich von 515 - 520 nm und die Extinktion in der Größenordnung von 0,4. Das Maxima der andern Substanzen liegt über 600 nm und die Extinktion ist kleiner als 0,1. Carbenicillin, das eine Carboxylgruppe in der Seitenkette trägt, nimmt eine Zwischenstellung ein.

I. Nachweis von Ampicillin mit Kupfersalzen

Die Reaktion wurde stöchiometrisch untersucht. Dafür wurde eine gleichbleibende Menge Ampicillin und verschiedene Mengen Kupfersulfatlösung zusammengegeben und mit 2N-NaOH auf jeweils dasselbe Volumen aufgefüllt. Die Extinktion wurde im Maximum bei 520 nm gemessen. Dabei zeigte sich folgender Zusammenhang: Setzt man weniger als 1 Mol $CuSO_4$ pro Mol Ampicillin ein, so steigt die Extinktionskurve linear an. Sie erreicht bei einem Molverhältnis von 1 : 1 ihr Maximum. Wird $CuSO_4$ im Überschuß verwendet, so verfärbt sich die rotviolette Lösung sehr schnell innerhalb Sekunden nach gelb und bei größeren Überschüssen weiter nach grün.

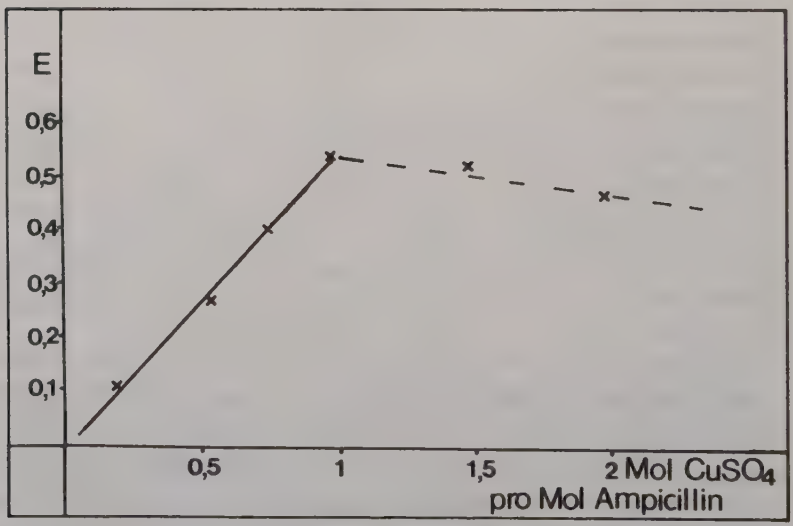


Abb. 10: Abhängigkeit der Extinktion und der Molverhältnisse von $CuSO_4$ und Ampicillin.

Aus diesem Grund ist es schwierig, die Reaktion für quantitative Bestimmungen einzusetzen, dies gelingt nur, wenn der Gehalt des zu prüfenden Produkts annähernd bekannt ist, und die Zugabe an Cu^{2+} Ionen entsprechend berechnet werden kann.

Wird die Reaktion in der hier beschriebenen Weise durchgeführt, so beträgt die kleinste nachweisbare Ampicillinmenge ca. 1 mg. Dabei ist es notwendig, nur einen Tropfen der 4 %igen Kupfersulfatlösung zu verwenden, um einen Überschuß an Kupferionen zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen stehen Kupfersulfat und Ampicillin in einem molaren Verhältnis von 3 + 1, die Farbe der Lösung ist unter diesen Bedingungen ca. 10 Sekunden beständig.

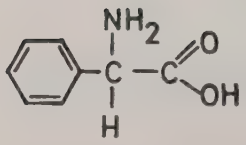
Schüttelt man die farbige Lösung von Ampicillin und Kupfersulfat in Natronlauge mit organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Äther, Benzol oder Äthylacetat, so bleibt die organische Phase farblos, die wäßrige Phase violett. Die Reaktion erinnert an die Chen-Kao[17] Reaktion, eine Reaktion mit der sich normalerweise 1,2-ständige OH- und NH_2-Gruppen erfassen lassen, dabei entstehen Kupferkomplexe[18].

Phenylglycin, Phenylglycinamid und Phenylglycylglycin geben die Reaktion allerdings nicht.

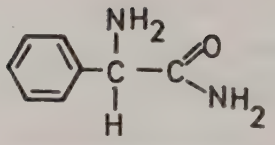
---

17) K.K. Chen und C.H. Kao, ref.Pharm.Zentralhalle Deutschl. 70, 27 (1929).

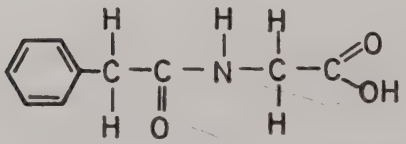
18) Z. Földi, T. Földi und A. Földi, Hung.Acta.chim. 11, 339 (1957).



Phenylglycin



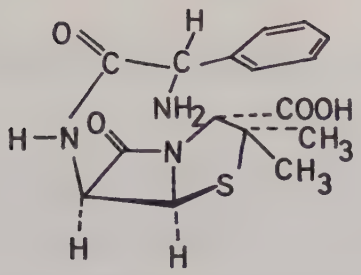
Phenylglycinamid



Phenylglycylglycin

Für den positiven Ausfall der Reaktion des Ampicillins mit Kupferionen ist die Aminogruppe der Seitenkette und der Penicillinstammkörper erforderlich, nicht aber der Phenylrest der Säurekomponente. Dies zeigt sich darin, daß die Reaktion auch mit Epicillin und Ciclacillin positiv ausfällt.

Modellbetrachtungen am Ampicillinmolekül verdeutlichen die sterischen Verhältnisse. Über die leicht gewinkelte Ebene des β-Laktamrings und des Thiazolidinrings legt sich die Säurekomponente. Dabei dürfte sich die Aminogruppe des Ampicillins in der Nähe der Carbonylfunktion des β-Laktamrings und des Schwefels des Thiazolidinringsbefinden.Das Kupferatom kann sowohl mit der Aminogruppe als auch mit dem Schwefelatom und der Carbonylfunktion des Ampicillins komplexartige Bindungen eingehen. Dies erklärt die blauviolette Färbung, die in ähnlicher Weise bei der Chen-Kao Reaktion eintritt. Die Carboxylgruppe dürfte bei der Farbgebung keine Rolle spielen, da sie auf der der Aminogruppe abgewandten Seite der Grundgerüstebene liegt.



II. Nachweis von Ampicillin mit Mandelin's Reagens

Bei allen untersuchten Penicillinen trat mit Mandelin's Reagens[19], das eine Lösung von Ammoniumvanadat in Schwefelsäure darstellt, eine grüne Färbung auf, verschieden war nur die Zeitdauer bis zum Eintreten der Farbe. Die grüne Farbe beruht darauf, daß die fünfwertige Vanadin-Verbindung zum V^{3+}-Ion reduziert werden, das in saurer Lösung grün gefärbt ist, gleichzeitig werden die Penicilline oxidiert. Dies zeigt die Papierchromatographie.

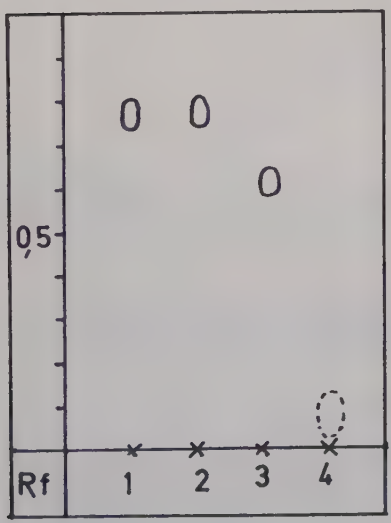


Abb. 11:
PC von:
1 = VCl_3-Lösung in 5 %iger HCl
2 = Lösung von Ampicillin, mit NH_4VO_3 in HCl behandelt
3 = NH_4VO_3-Lösung in 5 %iger HCl
4 = Ampicillin
Fließmittel: Methanol:HCl konz.:H_2O = 8:1:1
Papier Schleicher u. Schüll 2043 b
Die Flecke 1 und 2 sind grün, Fleck 3 gelbgrün gefärbt.
Ampicillin wurde mit Ninhydrin detektiert.

19) Fresenius' Z.anal.Chem. 23, 235 (1884).

Reste von Ampicillin konnten auf dem PC nicht nachgewiesen werden.

Löst man Ammoniumvanadat in konzentrierter Salzsäure und fügt Ampicillin zu, entsteht eine grüngefärbte Lösung, von der nach dem Verdünnen mit Wasser ein Elektronenspektrum aufgenommen wurde. Dieses zeigte volle Übereinstimmung mit dem Elektronenspektrum von VCl_3, das in verdünnter Salzsäure gelöst wurde.

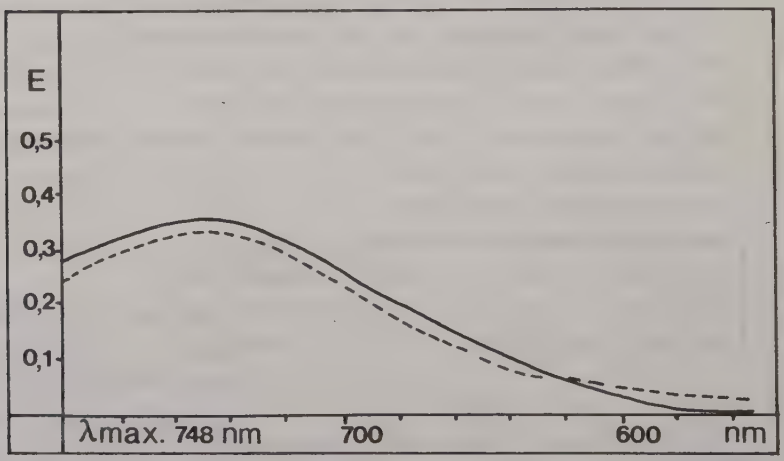


Abb. 12: Elektronenspektrum von ——— VCl_3 und - - - dem Reaktionsprodukt von Ampicillin und NH_4VO_3 + HCl.

Wird die Reaktion auf der Tüpfelplatte durchgeführt, so lassen sich bei Zugabe von 5 Tropfen Mandelin Reagens ca. 3 mg Ampicillin nachweisen. Bei kleineren Mengen tritt die Grünfärbung nur nach mehrstündigem Stehenlassen bzw. überhaupt nicht auf.

III. Nachweis von Ampicillin durch Diazotierung

Ampicillin-Na wird in $NaNO_2$-Lösung gelöst, diese Lösung läßt man unter Kühlung einige Zeit stehen, danach mit Salzsäure angesäuert und erwärmt, bis keine braunen Gase mehr entweichen. Die Lösung wird mehrmals mit Äther extrahiert, der Ätherrückstand wird auf dem DC mit Ampicillin und Mandelsäure verglichen. Dabei zeigt sich, daß aus Ampicillin neben anderen Abbauprodukten Mandelsäure entsteht.

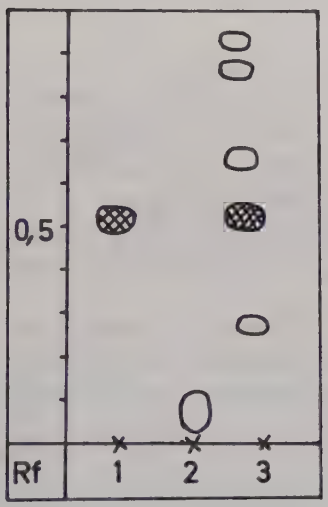
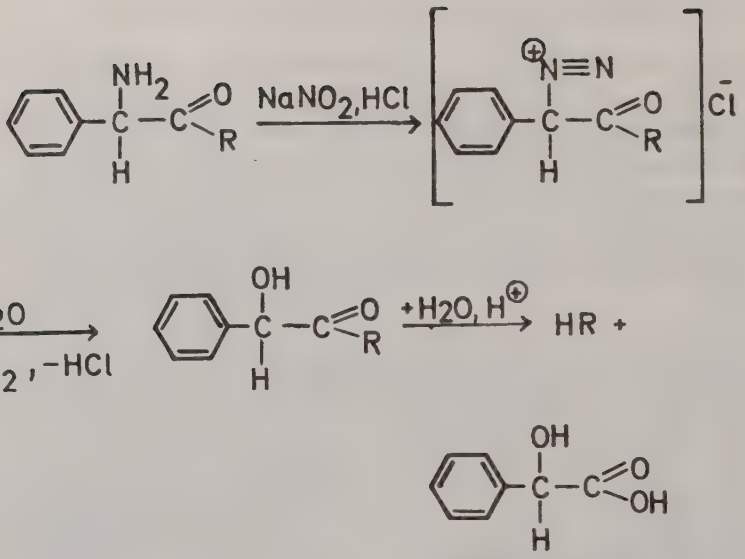


Abb. 13:
DC von:
1 = Mandelsäure
2 = Ampicillin
3 = Produkte aus Ampicillin bei der Diazotierung
Fließmittel:
$CHCl_3$/Aceton/HCOOH = 45/45/10
Detektion:
1. UV-Lampe
2. Besprühen mit 0,5 %iger Dimethylgelblösung, die schaffierten Flecke werden rot.

Die Reaktion ist für Phenylglycin von Tiemann und Friedländer beschrieben worden[20].

Die freie NH_2-Gruppe im Ampicillin wird durch $NaNO_2$ und HCl diazotiert, durch Erhitzen wird N_2 abgespalten und es bildet sich der entsprechende Alkohol. Gleichzeitig wird die Säureamidbindung durch das Erwärmen in saurer Lösung gespalten.

20) F. Tiemann und L. Friedländer, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 14, 1969 (1884).

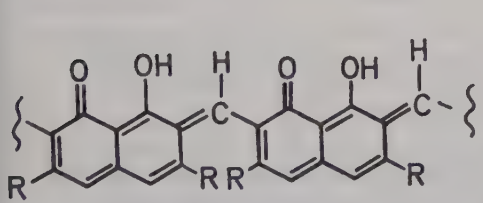


Es ist also möglich, Ampicillin-Natrium durch Diazotierung, anschließende Abspaltung des Stickstoffs und gleichzeitige Spaltung in Mandelsäure zu überführen und durch DC zu identifizieren.

C ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Überprüfung der Reaktionen von Penicillin G, Penicillin V und Ampicillin mit Chromotropsäure und Schwefelsäure nach den Angaben der Ph. Eur. II. Es wurde festgestellt, daß die Angaben bei Penicillin G, das nur eine Gelbfärbung gibt, und Penicillin V, das unter Violettfärbung reagiert, zutreffen. Verschiedene Chargen von Ampicillin verhielten sich aber nicht, wie dies die Ph. Eur. II beschreibt, und gaben keine Violettfärbung.

Bei Penicillin V und Substanzen wie Phenoxyessigsäure und Glykolsäure, die Teilstrukturen des Penicillins V entsprechen, konnte das farbige Reaktionsprodukt isoliert werden. Es wurde gezeigt, daß ein Produkt gebildet wird, das auch aus Formaldehyd, Chromotropsäure und Schwefelsäure unter den Reaktionsbedingungen von Bricker und Vail entsteht, nur ist der Anteil an Sulfonsäuregruppen größer.



Formaldehyd als Zwischenprodukt mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin abzufangen gelang nur bei der Glykolsäure, nicht aber bei der Phenoxyessigsäure und Penicillin V.

Die Brit. 1973 läßt zusätzlich mit Carbenicillin, Cloxacillin, Methicillin, Phenethicillin und Propicillin die Chromotropsäurereaktion durchführen. Die dabei auftretenden Färbungen werden durch die verschiedenen Säurekomponen-

ten der Penicilline verursacht, die in der konzentrierten Säure abgespalten werden.

Cefapirin, das eine Thioglykolsäuregruppierung enthält, reagiert bei der Chromotropsäurereaktion wie Penicillin V.

Bei der Suche nach Nachweisen für Ampicillin wurde die Reaktion mit Kupfersulfat und Natronlauge als schnelle und selektive Möglichkeit gefunden. Die Reaktion fällt bei den in den Arzneibüchern berücksichtigten Penicillinen nur beim Ampicillin positiv aus. Allerdings geben einige andere Penicilline wie Epicillin und Ciclacillin, die eine freie Aminogruppe in der Seitenkette enthalten, gleiche Reaktionen.

Die bei der Reaktion von Ampicillin mit Mandelin's Reagens auftretende grüne Färbung konnte, wie Papierchromatographie und Elektronenspektrum zeigten, auf eine Reduktion des Ammoniumvanadats zum grüngefärbten dreiwertigen Vanadin zurückgeführt werden. Die Reaktion ist allerdings nicht spezifisch für Ampicillin, sondern tritt bei allen geprüften Penicillinen auf, Unterschiede ergeben sich aber im zeitlichen Ablauf der Reaktion.

Eine weitere Möglichkeit, Ampicillin nachzuweisen, besteht darin, mit salpetriger Säure zu diazotieren, wobei der Stickstoff entweicht und gleichzeitig das Molekül gespalten wird, dünnschichtchromatographisch läßt sich Mandelsäure nachweisen.

D BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Dünnschichtchromatographie:
Es wurden Kieselgelplatten "schnellaufend" F 254 der Firma Merck verwendet.

UV- bzw. Elektronenspektren:
Die Spektren wurden mit einem Beckmann DB in 10 mm Quarzküvetten aufgenommen. Als Vergleich diente, wenn nichts anderes angegeben ist, Wasser.

Die Remissionsmessungen wurden mit einem Zeiss Chromatogrammspektralphotometer durchgeführt.

Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät der Firma Mettler FP 11 bestimmt, die Angaben sind unkorrigiert.

NMR-Spektroskopie:
Die Kernresonanzspekten wurden mit einem Bruker WP 80 PFT Gerät aufgenommen mit 80 MHz.

Elementaranalysen:
Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium Ilse Beetz, Kronach/Ofr. und im Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

IR-Spektroskopie:
Die Spektren wurden mit einem Gerät der Firma Beckman Acculab 2 aufgenommen, für die Messung wurden KBr Presslinge aus 1,2 mg Substanz und 100 mg KBr hergestellt.

Polarimeter:
Bei den Messungen wurde ein Gerät der Firma Hartnack verwendet.

Massenspektrometrie:
Die Massenspektren wurden mit einem Varian Gerät CH 7 aufgenommen.

Papierchromatographie:
Bei der Papierchromatographie wurde nach der aufsteigenden Methode gearbeitet. Die Laufstrecke betrug 10 cm. Es wurde Chromatographiepapier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 b verwendet.

Reaktionen der Penicilline mit Chromotropsäure und Schwefelsäure:
Die Reaktionen wurden entsprechend der Vorschrift der Ph. Eur. II bzw. der Brit. 1973 durchgeführt. Es wurde Schwefelsäure 95- 97 % P.A. der Firma Merck und Chromotropsäure der Firma Merck P.A. verwendet. Die angegebene Menge von jeweils 2 mg an Penicillin und Chromotropsäure wurde auf 0,1 mg genau eingewogen. Die Temperatur des Ölbads wurde während der Versuche mit einem Kontaktthermometer $\pm$ 2° genau eingehalten. Für die Versuche wurden nur neue Reagenzgläser verwendet, da es sich zeigte, daß die Versuche nur auf diese Weise eindeutige Ergebnisse liefern. Zudem ist es notwendig, die Versuche mehrfach zu wiederholen, da bei jeder Bestimmung kleinere Abweichungen bei der entstehenden Färbung möglich sind.

Umsetzung von Natriumchromotropat mit Formaldehyd:
(modifiziert nach K. Fuchs[21])
10,0 g Natriumchromotropat
2,6 g 35 %ige Formaldehyd-Lösung
40 ml H_2O
werden unter Rühren 4 Stunden am Rückfluß erhitzt. Das tiefrote Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen in ca. 400 ml eiskaltes Aceton gegossen, wobei ein dunkelroter Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abgenutscht und mehrmals mit Aceton und Äther gewaschen. Ausbeute 8 g. Diese Substanz wird als Zwischenprodukt A bezeichnet.

---

21) K. Fuchs, Dissertation, Tübingen 1968.

Umsetzung von Zwischenprodukt A mit Schwefelsäure

6 g Zwischenprodukt A wird auf dem Ölbad mit 8 molarer Schwefelsäure 4 Stunden auf 130° erhitzt. Nach dem Erkalten wird soviel eiskaltes Aceton zugegeben, bis eine violette Substanz ausfällt. Der Niederschlag wird mit Aceton und Äther gewaschen, die Ausbeute betrug 4,5 g.

Die Elementaranalyse des farbigen Produkts lieferte folgende Werte:

MG (pro Moleküleinheit) 522,4 entsprechend: $C_{21}H_{14}O_{12}S_2$

Ber.:	B	48,28	H	2,70	O	36,75	S	12,28
Gef.:	C	45,67	H	2,92	O	37,18	S	15,02

Der Zersetzungspunkt der Substanz liegt oberhalb 300° C, und es war nicht möglich, das Massenspektrum der Substanz aufzunehmen.

Da es sich um ein polymeres Molekül handelt, lieferte auch das NMR-Spektrum keine verwertbare Daten.

Auch das IR-Spektrum der Substanz ist wenig aussagekräftig.

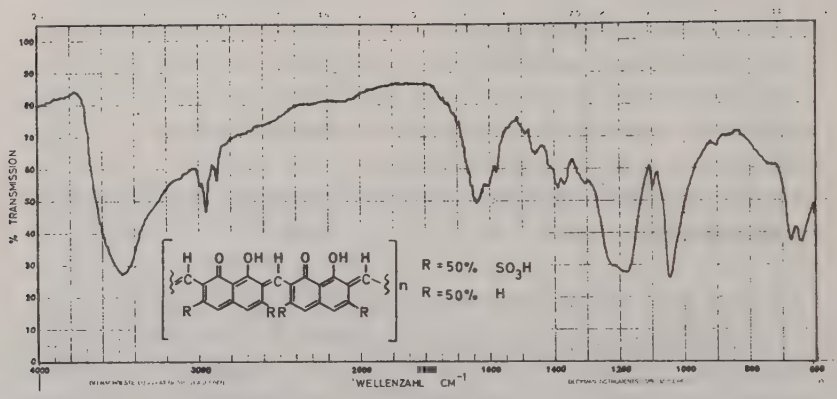


Abb. 14: IR-Spektrum des farbigen Produkts aus Formaldehyd und Chromotropsäure unter den Bedingungen von Bricker und Vail.

Zum Vergleich das IR-Spektrum der Chromotropsäure:

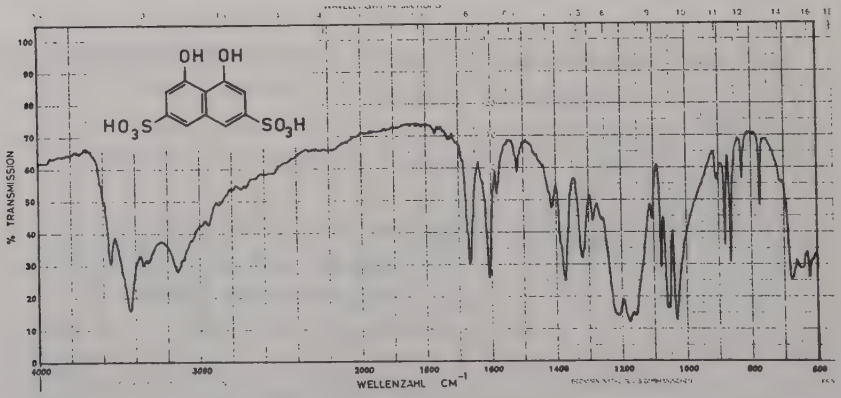


Abb. 15: IR-Spektrum der Chromotropsäure

Reaktion von Penicillin V mit Chromotropsäure und Schwefelsäure:

1 g Penicillin V und 1 g Chromotropsäure wurden in 20 ml konz. H_2SO_4 4 min auf dem Ölbad auf 150° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch in 400 ml eiskaltes Aceton gegossen, dabei fiel ein blauvioletter Niederschlag aus. Zur Vervollständigung der Ausfällung wurde diese Mischung noch 24 Stunden bei -20° gelassen. Der dabei gebildete Niederschlag wurde auf einer Nutsche gesammelt und mehrmals mit Äther und Aceton ausgewaschen. Die Ausbeute betrug ca. 200 mg.

Reaktion von Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid mit Chromotropsäure und Schwefelsäure:

0,43 g Phenoxyacetamid bzw. 0,21 g Glykolsäureamid wurden in 10 ml konzentrierter H_2SO_4 gelöst, und wie oben behandelt. Die Ausbeute betrug jeweils 600 mg eines farbigen Produkts.

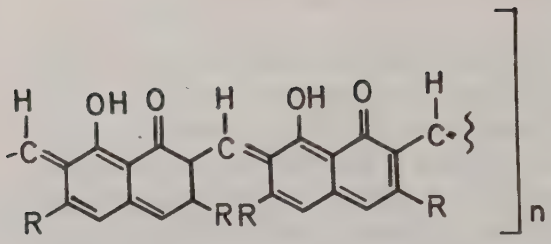
DC und Elektronenspektren der farbigen Produkte aus Penicillin V, Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid stimmten überein.

Das IR-Spektrum der Substanz lieferte keine verwertbare Aussage. Das Massenspektrum zeigte den Peak mit der größten Massenzahl bei 64 $\frac{m}{e}$, dies entspricht einer SO_2-Einheit, weitere Aussagen sind jedoch nicht möglich.

Die Elementaranalyse des aus Penicillin V gebildeten Produkts gab folgende Werte:

Ber.:	C	42,14	H	1,67	Na	5,38	O	34,80	S	16,05
Gef.:	C	41,10	H	2,90	Na	5,17	O	34,55	S	16,06

Die Elementaranalyse deutet auf ein Molekül der folgenden Struktur hin:



R = 25 % H
R = 75 % SO_3H

Zur Aufnahme der Elektronenspektren in Abb. 1, 4 und Abb. 9 wurden 20 mg Penicillin V bzw. äquimolare Mengen der anderen Substanzen und 20 mg Chromotropsäure in 20 ml H_2SO_4 konz. 4 min auf dem Ölbad auf 150° erhitzt und anschließend mit Wasser auf 100 ml verdünnt. Da es nicht bekannt war, wie groß die Umsetzungsrate der Reaktion war, wurde die Extinktion der jeweiligen Lösungen angegeben.

Zum Nachweis von Formaldehyd aus Penicillin V durch Gaschromatographie wurden in einem fest verschlossenen Gefäß 2 mg Penicillin V in 2 ml H_2SO_4 konz. 4 min auf 150° erhitzt. Der Ansatz wurde auf 70° abgekühlt und verschiedene Mengen der Gasphase eingespritzt. Dabei wurde eine 2 m 8" Stahlsäule mit 15 % Polypropylenglykol auf Celite 545 verwendet, die Detektion erfolgte mit einem FID.

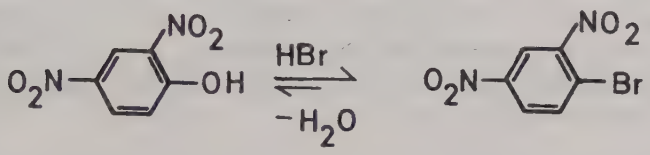
Es resultierten aber keine verwertbaren Ergebnisse, da Penicillin V sehr viele Bruchstücke bildet und Formaldehyd in der Gasphase polymerisiert.

Geschwindigkeit der Ätherspaltung von Phenoxyessigsäure und 2,4-Dinitrophenoxyessigsäure

Gearbeitet wurde in 48 %iger HBr. Variiert wurden Reaktionszeit und Temperatur. Die Reaktionsgeschwindigkeit sollte durch UV-Remissionsmessung der dabei entstehenden Phenole auf einer DC-Platte bestimmt werden. Dabei traten folgende Schwierigkeiten auf:

1. Es war notwendig, das Verhältnis von Ausgangs- zu Endpunkt zu bestimmen. Das bei der Ätherspaltung der Phenoxyessigsäure entstehende Phenol ist flüchtig.

2. Das bei der Ätherspaltung aus 2,4-Dinitrophenoxyessigsäure entstehende 2,4-Dinitrophenol wird teilweise durch HBr zu 2,4-Dinitrobrombenzol substituiert.



Deshalb war es nicht möglich, eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

Für die Remissionsmessungen wurden DC-Platten der Firma Merck ohne Fluoreszensindikator verwendet. Als Fließmittel diente Benzol.

Reaktion von Carbenicillin mit konzentrierter Schwefelsäure:
6,2 g Carbenicillin wurden mit 10 ml H_2SO_4 konz. 4 min auf 150° im Ölbad erhitzt, nach dem Abkühlen wurden 50 ml Wasser zugegeben und anschließend mit 3 mal 30 ml Äther extrahiert. Dabei blieben nach dem Abdampfen des Äthers ca. 10 mg Rückstand, die durch DC geprüft wurden.

Entsprechend wurden Phenethicillin und Propicillin behandelt, die Mengen der Rückstände lagen jeweils unter 10 mg.

Die Darstellung des Phenylglycinamids wurde nach Tiemann und Friedländer[22] durchgeführt.

---

22) F. Tiemann und L. Friedländer, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 14, 1968 (1884).

Reaktion von Phenylglycinamid mit konzentrierter Schwefelsäure:

2 g Phenylglycinamid wurden in 20 ml konz. H_2SO_4 gelöst und 10 min im Ölbad auf 150° erhitzt, wobei eine rötliche Färbung auftrat. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit Wasser verdünnt, wobei die Farbe verschwand. Die Mischung wurde in drei gleiche Teile geteilt, ein Teil wurde mit $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert, der zweite Teil mit NaOH-Lösung auf pH 12 gebracht, der dritte Teil, der unverändert blieb, wurde ebenso wie die beiden andern mit Äther extrahiert.

Beim ersten und dritten Teil betrug der Rückstand nach dem Verdampfen des Äthers weniger als 2 mg, beim Extrakt der neutralen Lösung blieben ca. 10 mg eines flüssigen Rückstands von charakteristischem Geruch, die Substanz erwies sich auf dem DC als identisch mit Benzaldehyd.

Darstellung und Untersuchung der α-Phenoxypropionsäure:

α-Phenoxypropionsäure wurde über den Äthylester hergestellt, der mit KOH verseift wurde[23]. Zusätzlich zum Schmelzpunkt wurde die Substanz durch ihr Massenspektrum identifiziert.

23) C.A. Bischoff, Ber.dtsch.chem.Ges. 33, 925 (1900).

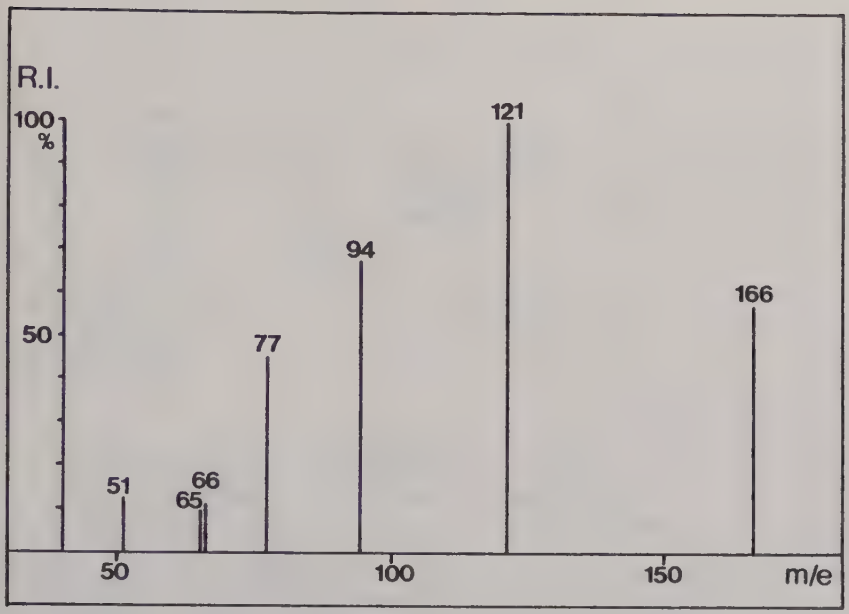
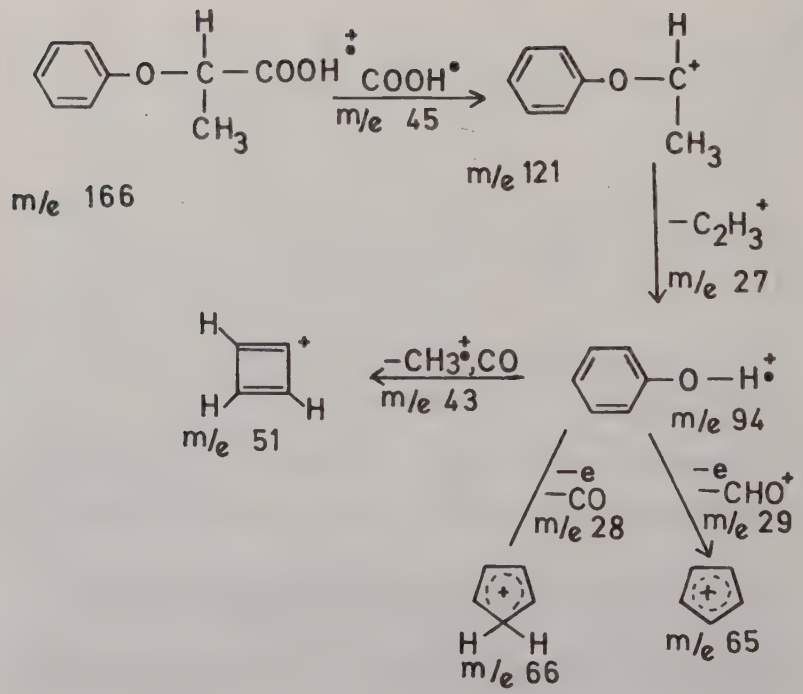


Abb. 14: Massenspektrum der α-Phenoxypropionsäure

Die Peaks lassen sich durch das folgende Zerfallschema erklären.



Darstellung und Untersuchung der Phenylthioglykolsäure:
Zuerst wurde Thiophenol dargestellt[24] und daraus die Phenylthioglykolsäure[25].

Der Schmelzpunkt der Substanz betrug nach mehrmaligem Umkristallisieren 61°.

Zusätzlich zum Schmelzpunkt wurde die Substanz durch NMR-Spektrum und Massenspektrum identifiziert.

---

24) E. Bourgeois, Ber.dtsch.chem.Ges. 28, 2319 (1895).
25) L. Ramberg, Z. für phys.Chem. 34, 562 (1900).

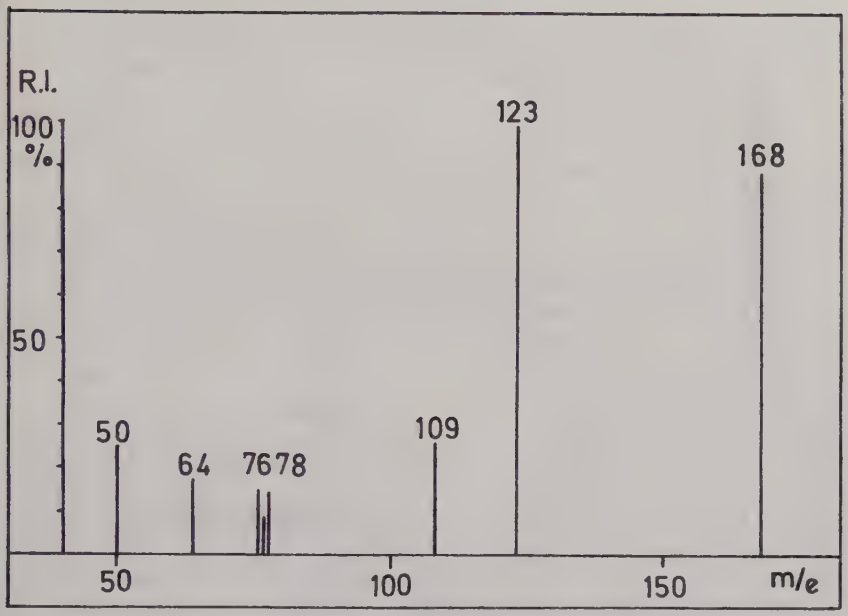
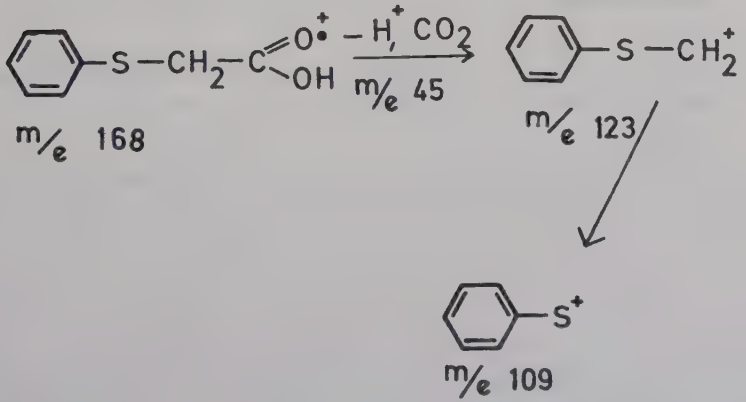


Abb. 15: Massenspektrum von Phenylthioglykolsäure

Der Peak bei 168 m/e entspricht dem Molekülion. Die Peaks bei m/e 78 bzw. m/e 76 sind dem aromatischen Ring zuzuordnen.



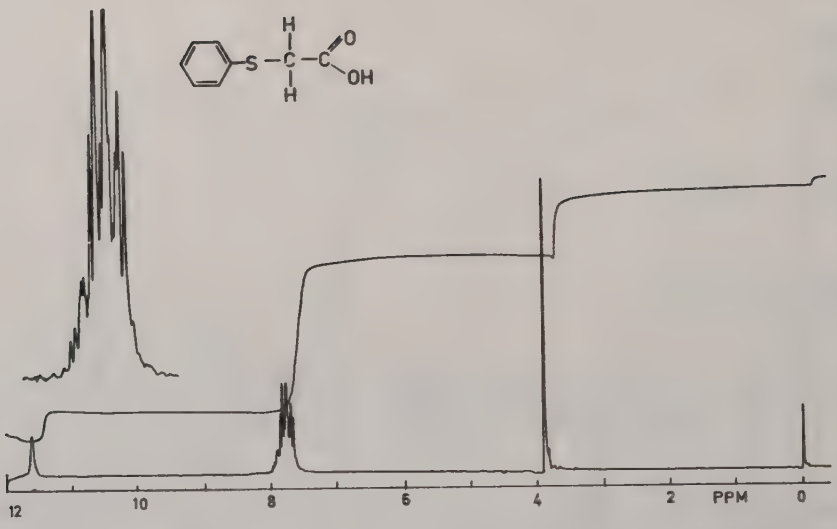


Abb. 16: NMR-Spektrum von Phenylthioglykolsäure

Die aromatischen Protonen erscheinen in einem komplizierten Multiplett bei 7,8 ppm, die Protonen der Methylengruppe bei 3,8 ppm und das Proton der Carboxylgruppe, am stärksten zum tiefen Feld verschoben, bei 11,6 ppm.

Die Integralhöhen entsprechen jeweils den zu erwartenden Ergebnissen.

Als Referenzsubstanz diente TMS, als Lösungsmittel wurde $CDCl_3$ verwendet.

Reaktion von Ampicillin mit salpetriger Säure:
0,2 g Ampicillin wurden in 6 ml 2N-NaOH gelöst und 30 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 10 ml 2N-HCl zugefügt und 35 mg $NaNO_2$ in 5 ml 2N-HCl gelöst, zugetropft. Danach wurde die Mischung nochmals 15 min zum Sieden erhitzt und anschließend mit 3 mal 20 ml Äther extrahiert. Der Rückstand wurde nach dem Verdampfen des Äthers gewogen, die Ausbeute betrug 20 mg eines blaß gelb gefärbten Produkts, das hauptsächlich aus Mandelsäure bestand, wie das DC zeigte.

Die gefundene Mandelsäure zeigte bei der Prüfung im Polarimeter keine Drehung mehr.

Verwendete Reagenzien:

Dragendorff's Reagens:
Dragendorff I : 0,85 g $BiONO_3$/40 ml H_2O/10 ml CH_3COOH
Dragendorff II: 8,0 KI/20 ml H_2O
I und II werden zu gleichen Teilen gemischt + 4 Teile Essigsäure.

Ehrlich's Reagens:
2,0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd/10 ml H_2O/90 ml 6N-HCl.

Erdmann's Reagens:
20 ml H_2SO_4 konz. und 0,5 ml 0,15 %ige Salpetersäure.

Mayer's Reagens:
1,35 g $HgCl_2$/100 ml 5 %ige KI-Lösung.

Fröhde's Reagens:
konz. Schwefelsäure mit 0,5 Prozent Ammoniummolybdat.

Marquis' Reagens:
3 ml H_2SO_4 konz. und 3 Tropfen 35 %ige Formaldehydlösung.
$AgNO_3$-Lösung: 5 Prozent in Wasser
$CuSO_4$-Lösung: 2 ml 10 %ige NaOH und 3 Tropfen $CuSO_4$-Lösung 4 Prozent werden gemischt, es wurde $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ verwendet.

Reaktion von Ampicillin mit Kupferionen:
Zur Bestimmung des optimalen Molverhältnisses von Ampicillin zu Cu^{2+}-Ionen wurden je Bestimmung jeweils 20 mg Ampicillin eingesetzt. Dazu wurden verschiedene Mengen einer 1 %igen $CuSO_4$-Lösung gegeben und auf 10 ml mit N-NaOH aufgefüllt. Die Extinktion dieser Lösungen wurde bei 520 nm gemessen.

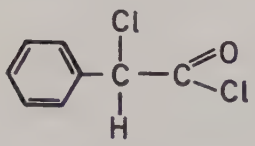
Papierchromatographie:
Es wurde Chromatographiepapier der Firma Schleicher und Schüll verwendet und nach der aufsteigenden Methode gearbeitet. Die Laufstrecke betrug jeweils 10 cm. Die Detektion des V^{3+}-Ions erfolgte mit 0,5 %iger $KMnO_4$-Lösung, Ammoniumvanadat erscheint als gelber Fleck.

Für die DC-Analysen wurden Substanz B und Substanz C, die aus Formaldehyd und Chromotropsäure unter verschiedenen Bedingungen entstehen, sowie die farbigen Produkte der Chromotropsäurereaktion aus Penicillin V, Phenoxyacetamid und Glykolsäureamid durch einen "stark sauren Kationenaustauscher" der Firma Merck in die freie Sulfonsäure überführt.

Bei der als Chromotropsäure bezeichneten Substanz, Chromotropsäure der Firma Merck p.a., handelt es sich um das Dinatriumsalz der Substanz.

Darstellung von Phenylglycylglycin:

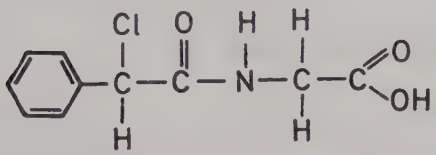
1. Herstellung von Zwischenprodukt 1:



2-Chlor-2-phenylessigsäure-chlorid

30 g Mandelsäure und 75 g PCl_5 wurden unter Rückfluß 1 Stunde erwärmt (Innentemperatur) und anschließend nochmals 90 min auf 140°. Nach dem Abdekantieren des festen Rückstands wurde im Vakuum destilliert (Kp_{25} = 105 - 106°).

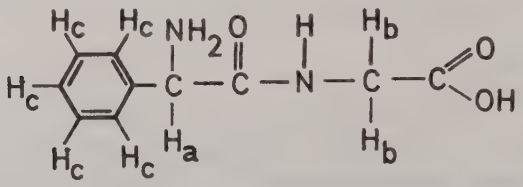
2. Herstellung von Zwischenprodukt 2:



3 g Glycin wurden in 40 ml N-NaOH gelöst und unter Eiskühlung und Rühren langsam 9,5 g Zwischenprodukt 1 und 40 ml N-NaOH zugetropft. Auf Zusatz von N-HCl schied sich ein schwach gelbes Öl als Unterphase ab. Das Öl wurde 2 mal in heißem Benzol gelöst und durch Petroläther wieder ausgeschieden. Es wurde ca. 8 g des Zwischenprodukts 2 erhalten.

4 g Zwischenprodukt 2 wurden in 40 ml konz. NH_3-Lösung gelöst und 5 Tage lang stehengelassen. Beim Einengen im Vakuum fiel eine feste weiße Substanz aus, die sich aber dünnschichtchromatographisch als nicht rein erwies. Die weiße Substanz wurde mit 20 ml gesättigter äthanolischer

NH_3-Lösung versetzt, und 3 Tage stehengelassen. Beim Einengen im Vakuum fiel ein weißes Pulver aus. Dieses wurde 2 mal aus Wasser umkristallisiert. FP. = 246°.
FP. lt. = 248° Phenylglycylglycin.



Phenylglycylglycin

Die Elementaranalyse der Substanz gab folgende Werte:

Ber.	C	57,69 %	H	5,77 %	N	13,46 %	O	23,18 %
Gef.	C	58,20 %	H	5,89 %	N	13,28 %	O	22,83 %

O wurde aus der Differenz berechnet.

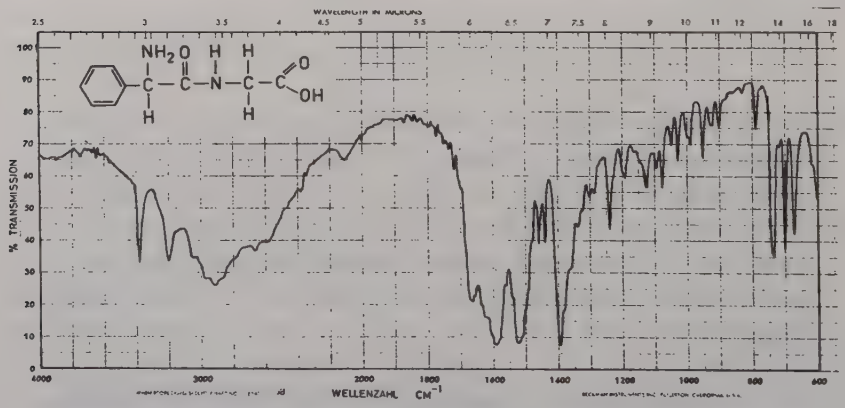


Abb. 17: IR-Spektrum des Phenylglycylglycin

Das NMR-Spektrum der Substanz zeigt nur die Protonen a, b und c.

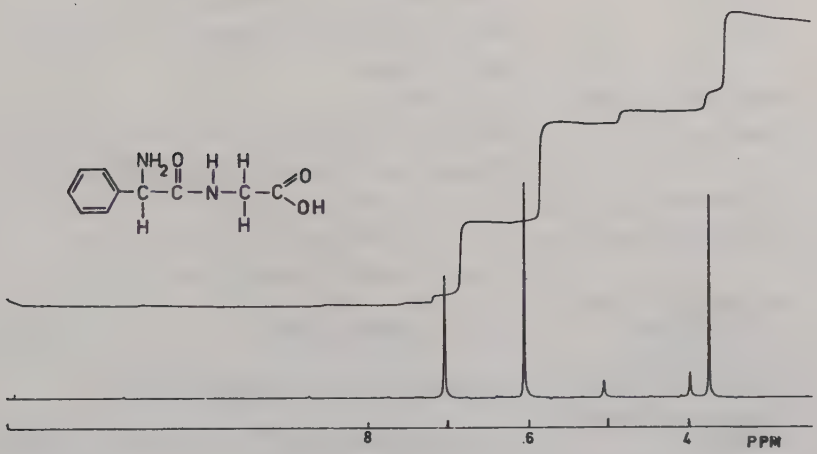


Abb. 18: NMR-Spektrum von Phenylglycylglycin

Proton a erscheint bei 5,23 ppm, die beiden Protonen b bei 4,01 ppm mit doppelter Integralhöhe und die 5 aromatischen Protonen c am stärksten zum tiefen Feld verschoben bei 7,54 ppm mit dem höchsten Integral. Bei 3,7 ppm erscheinen die Protonen des Dioxans. Dieser Wert entspricht den in verschiedenen Literaturstellen gefundenen Angaben. Als Lösungsmittel wurde 5 %ige D_2SO_4 in D_2O-Lösung verwendet, deshalb konnte TMS nicht als Referenzsubstanz verwendet werden. HDO wurde durch die Protonierung zum tiefen Feld verschoben, das Signal erscheint bei 6,04 ppm.

Lebenslauf

Name:	Eberhard König
Geboren:	09. 11. 1948
Geb.-Ort:	Bietigheim Kreis Ludwigsburg
Eltern:	Erika König, geb. Vogel Erich König
Beruf des Vaters:	Apotheker
Schule:	Volksschule 1955 - 1959 Reutlingen Gymnasium 1959 - 1967 Reutlingen
Reifeprüfung:	12. Juli 1967
Apothekenpraktikum:	01. 10. 1967 - 30. 09. 1969 in der Uhland'schen Apotheke Stuttgart
Pharmazeutische Vorprüfung:	10. September 1969
Studium der Pharmazie:	Oktober 1970 - September 1974
Pharmazeutische Prüfung:	10. September 1974 am Pharmazeutischen Institut Frankfurt
Beginn der vorliegenden Arbeit:	Oktober 1974 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff
Wissenschaftliche Hilfskraft:	ab Januar 1975
Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle:	ab Juni 1975

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

H. Auterhoff, E. Graf, H. Hoffmann, H. Janecke, K.A. Kovar, H. Linde, H. Oelschläger, K. Thoma (Pharmazie);

G. Schneider, E. Reinhard (Pharmakognosie);

H. Bock (Chemie);

D. Palm, H.P.T. Ammon (Pharmakologie);

W.P. Lötschert, A. Ried, G. Rosenstock (Botanik);

H.A. Müser (Physik);

G. May (Hygiene).